Aus dem hygienischen Institute der freien Hansestadt Bremen.
(Direktor: Professor Dr. Tjaden.)

University Library
MAY 25 1905
Stanford

Beiträge zur Frage der Arteinheit der Streptokokken.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

medizinischen Fakultät

der

Königl. Christian Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Hermann Rieke,
approb. Arzt aus Bremen.

Jena,
Gustav Fischer
1904.

Aus dem hygienischen Institute der freien Hansestadt Bremen.
(Direktor: Professor Dr. Tjaden.)

Beiträge
zur
Frage der Arteinheit der Streptokokken.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
medizinischen Fakultät
der
Königl. Christian Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

Hermann Rieke,
approb. Arzt aus Bremen.

Jena,
Gustav Fischer
1904.

No. 13.
Rektoratsjahr 1904/05.

Referent: Dr. Heller.

Zum Druck genehmigt:

Dr. Siemerling,
z. Z. Dekan.

Die Frage, ob die für den Menschen pathogenen Streptokokken einer einzigen Art angehören, d. h. morphologisch und in ihrer physiologischen Funktion untereinander gleich sind, oder ob man mehrere Arten von Streptokokken unterscheiden kann, ist in der letzten Zeit viel umstritten worden, ohne daß bis jetzt eine Einigung erzielt werden konnte. Die Frage hat nicht nur theoretisches Interesse für den Bakteriologen, sondern gerade in praktischer Hinsicht ist sie von hervorragender Wichtigkeit: Sie dient als Grundlage für die Serumtherapie der Streptokokkeninfektionen.

Einerseits muß man bei der Herstellung eines Streptokokkenserums eventuell darauf bedacht sein, das Serum mittels verschiedener Streptokokken zu gewinnen — andererseits gibt uns die Artverschiedenheit der Streptokokken möglicherweise die Erklärung dafür, warum ein Streptokokkenserum vielleicht in einem Falle hilft, im anderen vollständig im Stiche läßt. Es haben aus diesem Grunde die Darsteller von Streptokokkenserum: Aronson, Marmorek, Moser, Menzer u. a. m. die Frage nach der Arteinheit der Streptokokken diskutiert. Es seien hier aus einer Arbeit Marmoreks einige Stellen angeführt. „Schon in unserer Arbeit über den Streptokokkus (Annales de l'Institut Pasteur. Juli 1895) haben wir bei der Besprechung der Frage der Unterarten jegliche Bedeutung und entscheidenden Wert den äußeren Kennzeichen des Mikroben wie der Größe der einzelnen, die Ketten bildenden Körner oder der Fähigkeit, die Bouillonkultur zu trüben oder schließlich der Länge der Ketten abgesprochen." — „Es gibt Eigenschaften, welche allen Gliedern einer Bakterienart zukommen; das sind jene, welche Folge der ursprünglichen Lebensfunktionen sind." . . . . „Zwei Eigenschaften, die wir seit mehreren Jahren studieren, müssen in erster Reihe genannt werden: Es sind dies die in vivo vor sich gehende Hämolyse des Kaninchenblutes und die Unfähigkeit des Streptokokkus im eigenen Kulturfiltrat zu wachsen. Seit Beginn unserer Versuche über die Virulenzsteigerung der Streptokokken haben wir konstatiert, daß das Blut der Kaninchen, welche uns zur Tierpassage dienen, sich noch im Körper löst und eine klare, durchsichtige Burgunderfarbe annimmt. Diese Eigenschaft, die roten Blutkörperchen in den Gefäßen selbst aufzulösen, ist nicht bloß eine Fähigkeit, welche den Streptokokken allein zukommt, sondern — und dieses steigert ganz besonders den Wert dieses unterscheidenden Merkmales — sie wächst im geraden

Verhältnis mit der Virulenz. Je virulenter ein Streptokokkus ist, um so rascher und besser löst er das Blut im Körper seines Wirtes. Die Hämolyse in vitro kann jedoch verschiedene leichte Abweichungen je nach der Abstammung des Mikroben darbieten." . . . .

„Was das zweite, allen Streptokokken gemeinsame Zeichen betrifft, von dem wir sofort reden werden, so behalten die beiden Streptokokken, jener des Scharlachs und der Druse, ihre gesonderte Stellung, aber stets so, daß der Streptokokkus, den man beim Scharlach findet, trotz eines geringen Unterschiedes mit den anderen Kettenformen des Menschen übereinstimmt, während der Streptokokkus der Druse diese gemeinsame Eigenschaft fast gar nicht besitzt. Wir haben davon in einer Mitteilung gesprochen, die wir in der Pariser biologischen Gesellschaft gemacht haben. Wir sagten daselbst: „Einige Stunden nach Impfung in den Nährboden, selbst in einen, der den Lebensbedürfnissen des Streptokokkus am besten entspricht, hört dieser gänzlich auf sich zu vermehren; von diesem Augenblicke an beginnen die Ketten zu Boden zu fallen und die Flüssigkeit wird vollkommen klar. Wenn man die Kultur filtriert, und wenn man in dieses Filtrat eine Spur von Streptokokken wieder impft, findet keine weitere Vermehrung derselben statt. Wir müssen jedoch hinzufügen, daß die eingeimpften Mikroben 14 Tage und länger lebend bleiben. Wenn man eine weitere Entwickelung in einem so beschaffenen Nährboden zu erzielen wünscht, ist es unbedingt notwendig, demselben eine kleine Menge eines frischen Nährstoffes (z. B. gewöhnlicher Bouillon oder etwas konzentrierter Bouillon) hinzuzusetzen. Wenn man somit eine geringe Quantität frischen Nährsubstrats einer Kultur hinzusetzt, in der jede Mikrobenentwickelung aufgehört hat, so sieht man schon nach einigen Stunden diese wieder von neuem beginnen und die Flüssigkeit wieder trübe werden."

So kommt Marmorek zu dem Resultate, daß alle Streptokokken des Menschen derselben Art angehören (nur der Streptokokkus der Pferdedruse ein ganz verschiedener sei) und der Streptokokkus der Scharlachangina quantitative Abweichungen zeige, im Grunde aber den anderen gleiche. Aus diesem Grunde „beharrt er auf der Arteinheit der Streptokokken". Auch andere Forscher kommen zu demselben Resultate, daß es sich „bei aller Verschiedenheit der einzelnen Stämme doch nur um Uebergänge von einer Form zur anderen handelt". Es soll hier nicht weiter auf die einzelnen Arbeiten eingegangen werden, die im Literaturverzeichnis angegeben sind.

Schottmüller veröffentlichte eine Arbeit über „die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar" [1]). Da diese Arbeit den Ausgangspunkt der später folgenden Untersuchungen bildete, so sei es gestattet, auf den Inhalt etwas näher einzugehen. Schottmüller unterscheidet auf Grund des verschiedenen Wachstums der Streptokokken auf Blutagar und in Blutbouillon drei verschiedene Streptokokkenarten.

1) Streptokokkus longus pathogenes seu erysipelatos,
2) Streptokokkus mitior seu viridans,
3) Streptokokkus mucosus.

1) Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 20 u. 21.

Der Blutagarnährboden wurde folgendermaßen hergestellt: „Ich verfahre nach mannigfachen Versuchen so, daß ich zu 5 ccm gewöhnlichem Agar, der flüssig gemacht und auf 45° abgekühlt ist, ca. 2 ccm Blut von annähernd normalem Hämoglobingehalt hinzufüge. Ist Blut und Agar innig vermengt, wird die Mischung in eine Petri-Schale ausgegossen. Auf dem so hergestellten Nährboden wird nach Verdunstung des Kondenswassers von der zu untersuchenden Bakterienkultur oder von anderem bezüglich seines Bakteriengehaltes aufzuschließenden Materials, z. B. Eiter, eine genügende Menge ausgestrichen. Man erzielt so ein Oberflächenwachstum. Nicht bei allen Bakterienarten gleicht diesem das Aussehen der Kolonieen im Inneren des Nährbodens, so daß es häufig erwünscht ist, auch das Tiefenwachstum der Bakterienart zu beobachten. In diesem Falle und öfters dann, wenn man aus einem Bakteriengemisch die verschiedenen Arten isolieren will, wird man den noch flüssigen Blutagar im Röhrchen mit dem Material beschicken und dann erst in die Schale ausgießen.“ Das dem Agar zugesetzte Blut war stets Menschenblut. Ueber das Verhältnis, in welchem Blut und Bouillon zur Blutbouillon gemischt wurden, finden sich keine bestimmten Angaben.

Der Streptokokkus longus zeigte eine besondere Wachstumseigentümlichkeit, die folgendermaßen beschrieben wird: „Streicht man von seiner Kultur oder irgend einem Substrat — etwa Blut oder Eiter — in dem er enthalten ist, auf einer Blutagarschale aus oder legt eine Mischkultur an und gießt diese in eine Petri-Schale aus, so entwickeln sich schon innerhalb der nächsten 12—18 Stunden bei Bruttemperatur graue, etwas unregelmäßig rundliche Kolonieen an der Oberfläche und ähnliche, meist aber wetzsteinförmige Kolonieen im Innern des Nährbodens, welche einen durchaus charakteristischen kreisrunden, hellen Hof um sich gebildet haben. Dieser durch völlige Resorption des Hämoglobins entstandene Hof hat einen Durchmesser von ca. 2—3 mm, je nach dem Alter der Kultur. Nur in einem Falle ist die Hämolyse des Streptokokkus nicht so augenfällig, nämlich dann, wenn man so viel Keime in ein Blutagarröhrchen einsät, daß sich die einzelnen Kolonieen hernach auf der Platte in der Entwickelung gegenseitig hemmen. Solche Platten haben nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank einen schmutzig braunroten Farbenton angenommen. Der beschriebene helle Hof ist um die Kolonieen herum nicht zu erkennen. Diese Bemerkung ist praktisch wichtig, weil öfters, namentlich bei Leichen, im Blut so massenhaft Streptokokken gefunden werden, daß die Blutagarmischkulturen bei oberflächlicher Betrachtung nur eine Veränderung ihres Farbentones zeigen und vom weniger Geübten das Wachstum der Kolonieen übersehen werden kann. Bei Züchtung der Streptokokken in Blutbouillon wird die hellrote Farbe desselben allmählich in ein Burgunderrot verwandelt. Diese Wachstumseigentümlichkeit des Streptokokkus habe ich nun schon seit 7 Jahren als eine ganz konstante Erscheinung bei allen Stämmen der verschiedensten Provenienz immer wieder gefunden, mochte es sich um frische oder alte, langefortgezüchtete, um hoch oder schwach virulente Kulturen handeln; so glaube ich behaupten zu können, daß der in Rede stehende Kokkus in der geschilderten Weise unter allen Umständen wächst.“

Ein ganz verschiedenes Verhalten auf diesen Nährböden zeigte der Streptokokkus mitior seu viridans: „Derselbe bildet, auf Blutagar ausgestrichen, nach 24-stündigem Wachstum bei 37° auf dem

Impfstrich eine sehr feine graue oder schwarzgraue Auflagerung, nur wenn das Ausgangsmaterial reichlich aufgetragen wird, findet ein etwas üppigeres Wachstum statt. Im allgemeinen war das Wachstum aller Stämme dieser Gruppe ein gleichartiges, nur bei einzelnen Vertretern fand die Entwickelung recht langsam statt, so daß zuweilen, namentlich bei den ersten Generationen, 36—48 Stunden vergingen, bis makroskopisch eine Entwickelung deutlich sichtbar war. Andere Stämme boten wieder ein üppigeres Wachstum dar, als die Mehrzahl derselben.

Findet ein isoliertes Auftreten von Kolonieen statt, so erscheinen dieselben zuerst als feine, fast farblose, später grau bis grünschwarze Punkte; am 2. Tage haben sie sich zum Teil bis zu Kleinstecknadelkopfgröße entwickelt. Auch bei längerem Aufenthalt der Platten im Brutschrank findet eine weitere Ausdehnung der Kultur nicht statt.

Bezüglich des Wachstums im Innern des Nährbodens ist folgendes zu bemerken. Selten nach 24 Stunden, in der Regel aber erst nach 36—48 Stunden, ja zuweilen erst nach 3 und 4 Tagen, sieht man die Kolonieen in der Platte sich als feine grüne Punkte entwickeln, welche die Größe eines Stecknadelkopfes kaum erreichen. Die Hämolyse des Strept. m. ist so gering, daß eine makroskopisch sichtbare Resorption des Blutfarbstoffes bei Verwendung einer Blutagarmischung von 2:5 (s. oben) im allgemeinen nicht stattfindet. (Benutzt man aber zur Plattenkultur Agar, dem nur einige Tropfen Blut pro Röhrchen beigemischt sind, so läßt sich dann auch makroskopisch eine hämolytische Einwirkung auf das Nährsubstrat in Form eines schmalen hellen Saumes um die Kolonie herum erkennen.)

Blutbouillon wird durch den Streptokokkus diffus getrübt. Das Hellrot macht einer braunen Färbung Platz.

Die oben beschriebenen Wachstumseigentümlichkeiten — die Farbstoffbildung und das Unvermögen, auf oder in Blutagar (Mischungsverhältnis 2:5) Hämoglobin in sichtbarer Weise aufzulösen — bewahrten die Stämme nun, mochten sie über Jahresfrist auf gewöhnlichem oder Blutagar fortgezüchtet, täglich oder wöchentlich übertragen werden, oder mochten sie endlich eine Tierpassage — sofern dies überhaupt gelang — durchgemacht haben. Nur aus theoretischen Gründen sei erwähnt, daß ich ganz verschwindend selten Blut antraf, welches von einzelnen Stämmen in stärkerem Grade angegriffen wurde. In diesen, wie gesagt, praktisch belanglos seltenen Fällen, bildete sich dann um die einzelne Kolonie auch beim Verhältnis von Blut und Agar 2:5 ein schmaler heller Hof, aber erst ganz allmählich, im Verlauf von Tagen, und auch hier konnte noch ein grüner Schimmer erkannt werden."

Der Streptokokkus mucosus, der im ganzen 7mal bei ganz verschiedenen Leiden gefunden wurde, verhält sich wiederum anders: „Als durchaus charakteristisch ist wieder die Kultur auf unserem Blutagar zu bezeichnen. Bei Bruttemperatur von 37° erhebt sich innerhalb 24 Stunden auf dem Impfstrich ein glänzender, saftig schleimiger, grüngrauer Belag, der nach weiteren 48 Stunden eine dunklere Färbung anzunehmen pflegt, aber der Glanz, das schleimige Aussehen schwindet; der Belag trocknet auch hier. Isolierte Kolonieen erreichen Linsengröße, anfangs erhaben, flachen sie nach einigen Tagen ab und zeigen zentral einen Nabel. Kolonieen im Innern des Blutagars erscheinen dunkelgrün, rund und sind nach 24-stündigem Wachstum über steck-

nadelkopfgroß. Makroskopisch konnte ich bei meinen Stämmen Hämolyse erst nach vielen Tagen beobachten.

Wurde eine Blutagarkultur ausschließlich bei 22° gezüchtet, so entwickelte sich in 48 Stunden wohl ein deutlicher, schleimiger Rasen, wenn auch nicht so üppig wie bei 37°, bemerkenswerterweise aber kam es bei dieser Kultur nicht zur Bildung des grünen Farbstoffes, der Belag zeigte nur eine dunklere Schattierung als der Nährboden.

Während einfache oder Zuckerbouillon sich nicht als günstiger Nährboden für den Strept. mucosus erwiesen hatte, genügte ein Zusatz von wenigen Tropfen Blut zu diesem Nährsubstrat, um ein reichliches Wachstum zu gewährleisten. Die Flüssigkeit war nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank von 37° diffus getrübt und grünlich verfärbt.

Seit $^1/_2$ Jahr wurden nun im hiesigen hygienischen Institut eine Reihe von Streptokokkenstämmen verschiedener Herkunft daraufhin untersucht, ob sich die Angaben Schottmüllers bestätigten. Von 30 Stämmen zeigten 25 die charakteristischen Eigenschaften des Streptokokkus longus bei Züchtung in Blutagar: Es bildete sich um die Kolonieen ein heller Hof von bald größerer, bald geringerer Ausdehnung, bei Züchtung in Blutbouillon trat die Burgunderrotfärbung ein. (Schon hier sei bemerkt, daß, wenn dann diese Kulturen einige Tage bei Zimmertemperatur im Schranke gestanden hatten, die Farbe aus Burgunderrot sich in dunkles Braunrot umgewandelt hatte, doch wurde hierauf zunächst kein besonderes Gewicht gelegt.) Von den Stämmen zeigten 5 keinen hellen Hof bei Wachstum auf gewöhnlichem Blutagar, doch trat bei Züchtung in Blutagar, der im Verhältnis von 5 Tropfen Blut zu 5 ccm Agar gemischt war, ein kleiner heller Hof auf. Die Kolonieen waren kleine schwärzliche Punkte, nur bei einem Stamm wurde ein grünlicher Schimmer beim Wachstum in Blutagar bemerkt. Blutbouillon färbte sich in 3 Tagen braunrot. — Hiernach zeigten die ersten 25 Stämme die Eigenschaften des Streptokokkus longus, die letzteren 5 diejenigen des Streptokokkus mitior seu viridans nach Schottmüller. Leider zeigten die Stämme des Streptococcus mitior geringe Lebensdauer bei der Fortzüchtung, so daß bald 3 verloren gingen. Die beiden anderen, welche als Strept. mitior angesehen waren, stellten sich bei oft wiederholter Untersuchung als Streptokokkus longus heraus. Sie sind jetzt durch 5 Monate hindurch weitergezüchtet. Die Kolonieen bildeten auch in gewöhnlichem Blutagar einen hellen Hof, dessen Größe mit der Zeit eher zunahm. Blutbouillon färbte sich burgunderrot innerhalb 2—3 Tagen. Seit 8 Wochen stand nun nicht ein einziger Streptokokkenstamm zur Verfügung, bei dem sich die Charakteristika des Strept. mitior nachweisen ließen.

Während somit Schottmüllers Angaben über den Streptokokkus longus, soweit das Wachstum auf und im Blutagar in Frage kommt (über das Wachstum in Blutbouillon siehe später), sich bestätigten, kann über den Strept. mitior auf Grund obiger Untersuchungen ein Urteil nicht abgegeben werden. Hierzu genügt das vorliegende Material nicht. Es sei jedoch gleich darauf hingewiesen, daß der von Schottmüller angegebene Unterschied über das Verhalten beider Arten in Blutbouillon wahrscheinlich nicht besteht, da der Strept. longus die Blutbouillon bei genügendem Abwarten in derselben Weise

verändert, wie dies als für den Strept. mitior charakteristisch angegeben ist.

Schottmüller erwähnt, daß der Strept. longus beim Wachsen in Blutbouillon die hellrote Farbe derselben allmählich in Burgunderrot umwandelt, während der Strept. mitior die rote Farbe in Braunrot verändert. Auf Anregung von Herrn Professor Dr. Tjaden wurden nun die Umwandlung des Blutfarbstoffes, die dabei vor sich gehenden Veränderungen des Hämoglobins mit Zuhilfenahme des Spektroskopes genauer untersucht. Die Untersuchungen wurden angestellt mit einem Streptokokkenstamm von einer Scharlachangina, einem anderen von einer leichten Angina und einem Stamm von einer Gelenkeiterung. Alle 3 Stämme zeigten ein gleiches Verhalten, denn Unterschiede in der Zeitdauer und Reichlichkeit des Wachstums können nicht als prinzipielle gelten. Bei den Züchtungsversuchen (in Blutagar und Blutbouillon) wurde ausschließlich Menschenblut verwandt. Dieses wird in der Krankenanstalt bei Gefrierpunktsbestimmungen u. dgl. durch Venenpunktion gewonnen und, in sterilen Flaschen aufgefangen und defibriniert, auf Eis lange Zeit aufbewahrt, sodaß es im hygienischen Institute stets zur Verfügung steht. Der Blutagar wurde in den von Schottmüller angegebenen Verhältnissen hergestellt, die Blutbouillon im Verhältnis von 10—12 Tropfen auf 10 ccm Bouillon.

Setzt man zu 10 ccm derartiger Blutbouillon eine Oese Streptokokken (von einem der oben erwähnten Stämme), läßt dieselbe nach genügendem Durchschütteln im Brütschrank bei 37° stehen, so senkt sich etwa innerhalb 1—2 Stunden das Blut zu Boden, scharf abgesetzt von der klaren Bouillon. Nach 12 Stunden schon sieht man burgunderroten Farbstoff von dem Bodensatz in der Bouillon aufsteigen, und zwar ist die Färbung deutlich lackfarben. Schüttelt man dann die Bouillon nochmals durch und läßt sie weiter im Brutschrank stehen, so ist oft schon in einigen Stunden, sicher in 24 Stunden, die ganze Flüssigkeit intensiv burgunderrot — lackfarben — gefärbt; gefärbte Blutkörperchen senken sich nicht mehr zu Boden. Untersucht man jetzt die Flüssigkeit mikroskopisch, so sieht man außer den zahlreich gewachsenen Streptokokken die zerstörten roten Blutkörperchen, sogenannte Schatten. — Die Auflösung der roten Blutkörperchen geht wesentlich langsamer vor sich, wenn man die Blutbouillon nicht durchschüttelt, so sieht man z. B. nach 24 Stunden und selbst nach 72 Stunden nur spärliche Farbstoffwolken vom Boden aufsteigen. — Läßt man die Blutbouillon nun weiter bei 37° im Brutschrank stehen, so wandelt sich die burgunderrote Farbe allmählich in Braunrot um, es gibt Momente, in denen der Farbenton mit dem bloßen Auge, auch in Verdünnungen, nicht zu erkennen ist, und wo auch das Spektroskop noch keine Entscheidung fällt. Das Spektroskop zeigt dann die charakteristischen Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins und den dritten Absorptionsstreifen des neutralen Methämoglobins schon angedeutet, auch die Verdunkelung der rechten Hälfte des Spektrums, aber die Verschiebung der Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins ist noch nicht zu bemerken. Die Umwandlung von Burgunderrot in Braunrot geht im Erlenmeyer-Kolben innerhalb von 3—4 Stunden vor sich, dauert jedoch im gewöhnlichen Reagenzglas länger. Stellt man die mit Streptokokken verimpfte Blutbouillon im Reagenzglase in den Brutschrank, schüttelt nach 24 Stunden durch, so besteht nach 48 Stunden intensive Burgunderrotfärbung, nach

72 Stunden ist oft schon Braunfärbung eingetreten, vielfach jedoch erst am 4. Tage.

Man kann nun die Blutbouillon, ohne sie durchzuschütteln, so lange im Brutschrank stehen lassen, bis die Farbe beim Durchschütteln ständig braun erscheint, sodaß man den Uebergang über Burgunderrotfärbung an der ganzen Flüssigkeitsmenge überhaupt nicht zu Gesicht bekommt. Man bemerkt dann nur rote Farbstoffwolken über dem Bodensatz. — Diese Umwandlung des Blutfarbstoffes in Braunrot nach vorhergehender Burgunderrotfärbung zeigten außer den zu den sämtlichen folgenden Untersuchungen verwendeten 3 Streptokokkenstämmen auch sämtliche als Streptokokkus longus diagnostizierten 25 Stämme.

Nunmehr wurde die Blutbouillon in den einzelnen Phasen spektroskopisch untersucht. Als Vergleichsspektrum fungierte das Spektrum einer meist frischen Oxyhämoglobinlösung von Menschenblut, hergestellt durch Verdünnung von Blut mit 10fach verdünnter physiologischer Kochsalzlösung. Die frische Blutbouillon, unverändert durch Streptokokken, mit der NaCl-Lösung bis zur spektroskopischen Flüssigkeit verdünnt, gab ein normales Oxyhämoglobinspektrum. Die burgunderrot gefärbte Bouillon zeigte ebenfalls ein Oxyhämoglobinspektrum. Am schärfsten waren die Absorptionsstreifen, wenn die Blutbouillon zentrifugiert und dann durch Berkefeldt-Kerzen filtriert wurde. Die braunrot gefärbte Bouillon zeigte ein wesentlich anderes spektroskopisches Bild, das Spektrum des neutralen Methämoglobins (s. Abbildung). Mit bloßem Auge läßt sich die Umwandlung des Oxyhämoglobins in neutrales Methämoglobin an Verdünnungen oft besser erkennen als an unverdünnter Blutbouillon, der rote Ton der Farbe ist einem Gelbbraun gewichen. — Es war also das Oxyhämoglobin in neutrales Methämoglobin umgewandelt worden. Nun erhebt sich die Frage: Ist die Umwandlung des Oxyhämoglobins in neutrales Methämoglobin eine spezifische Wirkung der Streptokokken oder wandelt sich das Oxyhämoglobin von selbst im Laufe der Zeit in neutrales Methämoglobin um?

Läßt man Blutbouillon im Brutschrank ohne Zusatz von Bakterien stehen, so lösen sich schließlich auch die roten Blutkörperchen auf, es tritt Burgunderrotfärbung ein und zuletzt Braunfärbung. Dieser Prozeß verläuft jedoch sehr langsam, im Erlenmeyer-Kolben trat frühestens nach 8 Tagen im Brutschrank Auflösung der roten Blutkörperchen und nach 14 Tagen das Spektrum des neutralen Methämoglobins auf. Ebenfalls zeigte Blut ohne Zusatz von Bouillon, das im Reagenzglase im Brutschrank etwa 14 Tage gestanden hatte, im Spektrum neutrales Methämoglobin. (Blutbouillon im Reagenzglase blieb im Brutschrank 3 Wochen unverändert.) Daß es sich nicht um Wirkung von Bakterien handelte, wurde durch Untersuchung der Flüssigkeiten auf Keimfreiheit in jedem Falle festgestellt. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß das Oxyhämoglobin sich mit der Zeit in neutrales Methämoglobin umwandelt. Es liegt aber ein großer Unterschied in der Zeit, innerhalb welcher die Umwandlung durch Streptokokken verursacht wird, bezw. von selbst vor sich geht. Oxyhämoglobinlösungen, in denen die roten Blutkörperchen künstlich zerstört waren, sodaß sich die Lösung burgunderrot färbte, beweisen dies ebenfalls. Die Lösungen wurden teils mittels physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, teils mittels Bouillon, im Verhältnis von 0,5—3,0 ccm Blut zu 10 ccm Flüssigkeit; die roten Blutkörperchen

wurden durch dreimaliges Gefrierenlassen und nachfolgendes Wiederauftauen zerstört. Die Lösung hatte dann eine burgunderrote Färbung angenommen, jedoch heller und klarer als die Blutbouillon mit Streptokokkenzusatz. Diese Lösung blieb im Brutschrank 6 Tage lang unverändert (im Eisschrank über 3 Wochen), stets zeigte sich Oxyhämoglobin im Spektrum. Unter dem Einfluß von Streptokokken vollzog sich dann auch im Reagenzglase im Laufe von 12—24 Stunden die Umwandlung des OHB in n. MHB (neutrales Methämoglobin).

Nachdem nun feststeht, daß die Streptokokken in kurzer Zeit das nach Auflösung der roten Blutkörperchen freigelöste OHB in n. MHB umwandeln, erhebt sich die weitere Frage: „Ist diese Umwandlung des OHB in n. MHB an den Lebensprozeß der Streptokokken geknüpft?“ Zur Entscheidung dieser Frage wurden folgende Versuche angestellt. Eine 24-stündige Streptokokkenbouillonkultur wurde durch Berkefeldt-Kerzen keimfrei filtriert, das Filtrat sorgfältig auf Sterilität durch Verimpfen größerer Mengen in Bouillon untersucht. Dann wurden von dem Filtrat einem Blutbouillonröhrchen der gewöhnlichen Mischung 10 ccm zugesetzt, auch dem Filtrat direkt Blut zugesetzt im Verhältnis von 10 Tropfen zu 10 ccm Filtrat. Dabei zeigte sich keine Hämolyse, nachdem die Röhrchen 8 Tage lang im Brutschrank gestanden hatten. Ein Teil der Röhrchen wurde zur besseren Vermengung des Filtrates mit dem Blute wiederholt durchgeschüttelt — ohne daß sich das Resultat änderte. Nach längerer Zeit tritt auch hierbei Hämolyse und Umwandlung des OHB in n. MHB ein, wie bei nicht verimpfter Blutbouillon. — Ferner wurde Blutbouillon, in der durch Streptokokken das OHB frei gelöst war (Burgunderrotfärbung und spektroskopischer Nachweis von OHB) zentrifugiert und abfiltriert durch Berkefeldt-Kerzen, das Filtrat sorgfältig auf Sterilität untersucht. Das Filtrat zeigte im Brutschrank noch nach 3 Tagen die Burgunderrotfärbung und spektroskopisch OHB-Spektrum; setzte man dann diesem Filtrat Streptokokken zu, so verwandelte sich in 12 Stunden die Burgunderrotfärbung in Braun, spektroskopisch wurde die Umwandlung des OHB in n. MHB bewiesen.

Es ist also bei den Versuchen keine Einwirkung des Streptokokkenfiltrates auf die roten Blutkörperchen und das Oxyhämoglobin zu Tage getreten. Dann bleibt noch die andere Möglichkeit, daß die Streptokokkenleiber Substanzen enthalten, welche die Hämolyse und Umwandlung des OHB in n. MHB zu stande bringen. Zur Entscheidung dieser Frage wurde wiederholt folgender Versuch gemacht.

Eine 24-stündige Streptokokkenbouillonkultur diente als Ausgangspunkt. Durch Abimpfen in Bouillonröhrchen wurde bewiesen, daß sie lebende Streptokokken enthielt. Dann wurde die Bouillonkultur eine Stunde auf 60° erhitzt, bei späteren Versuchen auf 70°, weil nach Simon eine Temperatur von 60° zur Abtötung der Streptokokken nicht sicher ausreichend ist. Darauf wurde in einwandsfreier Weise kontrolliert, daß die Bouillon lebende Streptokokken nicht mehr enthielt. Hierzu genügt (nach Simon) nicht ein Abimpfen in frische Bouillon; es wurde die abgetötete Streptokokkenkultur zentrifugiert und der Rückstand mit frischer Bouillon gemischt und in den Brutschrank gebracht. Dabei trat kein Wachstum ein, es wurde also mit abgetöteten Streptokokkenleibern gearbeitet. Diese wurden aus der Bouillonkultur zentrifugiert, 3mal durch Auswaschen mit sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung und nachfolgendes Zentrifugieren von eventuell anhängenden

gelösten Stoffen gereinigt und zuletzt der Bodensatz zum Versuch benutzt. Die Bakterienleiber wurden nun der Blutbouillon zugesetzt und ihr Einfluß auf die roten Blutkörperchen und das Oxyhämoglobin im Brutschrank beobachtet. Nach 6 Tagen lagen die Bakterienleiber noch auf dem scharf am Boden abgesetzten Blutbodensatz, von Hämolyse war nichts zu sehen, beim Durchschütteln war die Färbung der Blutbouillon hellrot, im Spektrum sah man das Spektrum des OHB. Einige derartige Röhrchen wurden täglich durchgeschüttelt, um eine genügende Vermengung der Bakterienleiber mit dem Blute zu erhalten — auch in diesen trat der Uebergang in Braunfärbung nicht ein. Die Bakterienleiber der abgetöteten Streptokokken sind also nicht im stande, die erwähnten Veränderungen des Blutes herbeizuführen. Daß dieser Prozeß nur durch die Lebensfunktionen der Streptokokken vor sich geht, beweist auch noch ein anderer Versuch: Es wurden wieder in gewohnter Weise Streptokokkenblutbouillonkulturen angelegt. Nachdem die Streptokokken die Blutbouillon lebhaft burgunderrot gefärbt hatten, wurde ein Teil der Röhrchen in den Eisschrank gesetzt, während die übrigen zur Kontrolle im Blutschrank blieben. Dann trat die Braunfärbung bei den im Eisschrank befindlichen nicht ein (während sie bei den im Brutschrank verbleibenden vorhanden war), nach 72 Stunden zeigte die spektroskopische Untersuchung noch OHB. Setzte man die Röhrchen dann wieder in den Brutschrank, so entwickelte sich in 12 Stunden die Braunfärbung.

Diese Versuche beweisen in gleicher Weise, daß die Auflösuug der roten Blutkörperchen und die Umwandlung des Blutfarbstoffes nur durch lebende Streptokokken zu stande kommen. Es seien nun noch einige besondere Beobachtungen erwähnt, die bei diesen Versuchen gemacht wurden.

2 Röhrchen Blutbouillon wurden zum Vergleich mit je einer Platinöse und je 0,5 ccm 24-stündiger Streptokokkenbouillonkultur geimpft. Nach völligem Durchmischen kamen die Röhrchen in den Brutschrank und es zeigte sich, daß nach 24 Stunden die Hämolyse in dem Röhrchen, welches mit 0,5 ccm Kultur verimpft war, weiter vorgeschritten war, als in dem anderen. Wurden dann beide Röhrchen durchgeschüttelt und weiter im Brutschrank belassen, so trat die Braunfärbung bei beiden in der gleichen Zeit ein. Der Unterschied in der Zeit, die die Auflösung der roten Blutkörperchen erfordern, bestand nicht, wenn derselbe Versuch im Erlenmeyer-Kolben gemacht wurde (s. unten). Will man den ganzen Prozeß des Abbaues beschleunigen, so ist es nur erforderlich, die Blutbouillon in ausgebreiteter Schicht von geringer Tiefe der Einwirkung der Streptokokken auszusetzen oder im Reagenzglase häufig durchzuschütteln. Ersteres wurde dadurch bewiesen, daß im Erlenmeyer-Kolben 30 ccm Bouillon mit 2 ccm Blut gemischt wurden, so daß die Bodenfläche etwa $^1/_2$ cm hoch bedeckt war. Wenn in dieser Mischung Streptokokken gezüchtet wurden, so hatte Durchschütteln keinen Einfluß auf die Schnelligkeit des Prozesses der Hämolyse. Also nur im Reagenzglase bei ruhigem Stehen desselben zeigt sich ein Einfluß der verschieden großen Bakterienmenge, und zwar nur auf die Hämolyse der roten Blutkörperchen. Bei der Umsetzung des Oxyhämoglobins in neutrales Methämoglobin spielt die Bakterienmenge anscheinend eine geringere Rolle.

Weiter wurde untersucht, ob die Menge des der Bouillon zugesetzten

Blutes von Einfluß ist. Den Bouillonröhrchen wurden 1 Tropfen, 3 Tropfen, 5 Tropfen, 0,5 ccm, 1,0 ccm, 2,0 ccm Blut zugesetzt und 3 Tropfen einer 24-stündigen Bouillonkultur. Ein Zusatz von 1—3 Tropfen Blut läßt die Burgunderrot- und Braunfärbung nicht genügend deutlich erkennen. Die Färbung der Bouillon ist ein schmieriges Rosa, das sich mit der Zeit auch unter Einwirkung der Kokken nicht ändert. In den anderen Röhrchen trat die Burgunderrotfärbung und Umwandlung des OHB in neutrales MHB in der üblichen Weise ein, nur das letzte Röhrchen, dem 2,0 ccm Blut zugesetzt waren, änderte sich nach der Burgunderrotfärbung nicht mehr, sondern behielt diese Farbe noch nach 10 Tagen. Bei Wiederholung dieses Versuches und Ausdehnung desselben auf 3 und 4 ccm Blutzusatz trat jedoch jedesmal Braunfärbung ein, und wurde spektroskopisch neutrales MHB nachgewiesen.

Diese Untersuchungsreihen sind deshalb von einiger Wichtigkeit, weil gegen das Kulturverfahren auf bezw. in Blutagar der Einwand gemacht worden ist, daß bei zu reichlichem Blutzusatz die bakteriziden Kräfte des Blutes das Wachstum der Kokken beeinträchtigen könnten. Die eben erwähnten Erfahrungen sprechen gegen diesen Einwand.

Besondere Erwähnung verdient noch die Tatsache, daß sämtliche hierauf untersuchten Streptokokkenstämme (etwa 25) die Blutbouillon zwar erst in Burgunderrot, dann aber gleichmäßig sämtlich in Braunrot verwandelten durch Umwandlung des OHB in neutrales MHB. Schottmüller erwähnt als einen charakteristischen Unterschied des Streptokokkus longus und Streptokokkus mitior, daß ersterer Blutbouillon burgunderrot färbt, letzterer braunrot. Die angeführten Versuche ergeben, daß diejenigen Streptokokkenstämme, die alle charakteristischen Eigenschaften des Streptokokkus longus bei der Züchtung auf und in Blutagar zeigen, die Blutbouillon schließlich braun färben durch Umwandlung des OHB in neutrales MHB. Man muß nur die genügende Zeit, 2—4 Tage, warten, bezw. die geeigneten Verfahren (Umschütteln, Züchtung im Erlenmeyer-Kolben) anwenden, damit diese Umwandlung eintritt. Es kann deshalb der von Schottmüller angegebene Unterschied in der Funktion des Streptokokkus longus und Streptokokkus mitior nicht bestätigt werden. Zur Zeit steht leider kein Streptokokkenstamm zur Verfügung, der als Str. mitior angesehen werden kann, um seine Wirkung auf Blutbouillon mit der des Str. longus zu vergleichen. Es soll jedoch nicht bestritten werden, daß eventuell Unterschiede im Wachstum der Streptokokken in und auf Blutagarnährböden eine Artunterscheidung der Kokken ermöglichen. Die obigen Untersuchungen berechtigen nicht, hierüber ein Urteil abzugeben.

Nach Abschluß der Untersuchungen kam mir eine Arbeit von Simon über „die Gifte der Streptokokken“ zu Gesicht. Nach derselben ist es anderen Untersuchern (Besredka) gelungen, hämolytisch wirksames Filtrat aus Streptokokkenbouillonkulturen herzustellen. Diese Versuche verdienen jedenfalls nachgeprüft zu werden.

Zusammengefaßt ist das Ergebnis der angeführten Versuche folgendes:

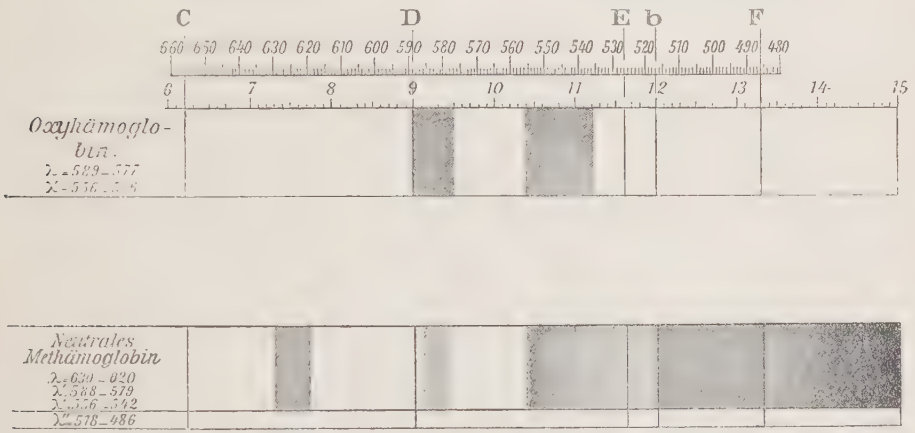
1) Die als Str. erysipelatos anzusprechenden Streptokokken lösen bei Züchtung in Blutbouillon die roten Blutkörperchen auf, machen das Oxyhämoglobin frei und verwandeln es in neutrales Methämoglobin. Makroskopisch zeigt sich dieser Vorgang in einer Umwandlung der

hellroten Farbe der Blutbouillon in Burgunderrot und schließlich in Braunrot. Von besonderen erleichternden oder erschwerenden Umständen hängt es ab, ob dieser Prozeß schneller oder langsamer vor sich geht.

2) Diese Umwandlung des Oxyhämoglobins in neutrales Methämoglobin ist eine Folge der physiologischen Funktionen der Streptokokken, sie ist geknüpft an den Lebensprozeß derselben. Weder durch das Filtrat einer Streptokokkenkultur konnte dieser Prozeß hervorgerufen werden, noch waren die Bakterienleiber der abgetöteten Streptokokken hierzu im stande.

3) Ein Unterschied in der Funktion der verschiedenen untersuchten Streptokokkenstämme (Str. erysipelatos) ist bei diesen Versuchen nicht bemerkt worden, sie verhielten sich sämtlich gleich.

4) Eine Unterscheidung von Streptokokkenarten durch diese Methode ist nicht gelungen, doch berechtigen die Versuche nicht endgültig zu beurteilen, ob es verschiedene Arten von Streptokokken gibt.



(Die Abbildungen sind entnommen aus dem Arch f. Anat. u. Phys. 1901. Phys. Abt. Suppl. p. 178 ff. Beiträge zur Spektroskopie des Blutes von Dr. E. Ziemke und Dr. F. Müller.)

Literatur.

1) Aronson, Untersuchungen über Streptokokken- und Antistreptokokkenserum. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 42/43.)
2) —, Weitere Untersuchungen über Streptokokken. (Deutsche med. Wochenchr. 1903. No. 25.)
3) —, Ueber neuere Fortschritte auf dem Gebiete der Serumtherapie, mit besonderer Berücksichtigung des Antistreptokokkenserums. (Ber. d. deutsch. pharm.-Ges. 1903. No. 446.)
4) —, Bemerkungen zu dem Artikel des Herrn Dr. Moser: Ueber Antistreptokokkenserum bei Scharlach. (Berl. klin. Wochenschr. 1903. No. 1.)
5) Baginsky, Ueber einen konstanten Bakterienbefund bei Scharlach. (Berl. klin. Wochenschr. 1900. No. 27/28.)
6) —, Ueber Antistreptokokkenserum bei Scharlach. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 48.)
7) Buss, Ueber die Beziehungen zwischen Angina und akutem Gelenkrheumatismus. (Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. LIV.)
8) Escherich, Die Erfolge der Serumbehandlung des Scharlach etc. (Neue Therapie. 1903. No. 3.)
9) Gelbrich, Ueber Streptokokken im faulenden Tierblute. Diss. Tübingen, 1896.

10) Knorr, Experimentelle Untersuchungen über den Streptococcus longus. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XIII. 1893.)
11) Marmorek, Die Arteinheit der für den Menschen pathogenen Streptokokken. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 14/15.)
12) Meyer, Zur Einheit der Streptokokken. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 40.)
13) Pasquale, Vergleichende Untersuchungen über Streptokokken. (Zieglers Beiträge zur patholog. Anat. etc. Bd. XII.)
14) Piorkowski, Ueber Streptokokkenserum. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 48.)
15) Schottmüller, Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. (Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 20/21.)
16) Simon, Untersuchungen über die Gifte der Streptokokken. (Centralbl. f. Bakt. 1903. No. 3/4.
17) Ziemke und Müller, Beiträge zur Spektroskopie des Blutes. (Arch. f. Anat. u. Phys. Phys. Abt. 1901. p. 177 ff.)

Lebenslauf.

Ich, Hermann Christian August Rieke, reformierter Konfession, wurde am 20. Dezember 1877 zu Brake bei Lemgo geboren als Sohn des Pastors Hermann Rieke und seiner Frau Elise geb. Rohdewald. Meinen ersten Unterricht erhielt ich von meinem Vater, der seit 1879 als Pastor in Arsten bei Bremen angestellt ist. Von meinem 8. Lebensjahre an besuchte ich außerdem die Dorfschule in Arsten, kam dann in die Quarta des Gymnasiums zu Bremen, welches ich mit dem Zeugnis der Reife im Herbst 1896 verließ. Dann studierte ich in Freiburg i. B. zwei Semester Medizin, dann zwei Semester in Göttingen, wo ich im Juli 1898 das Tentamen physicum bestand; darauf verbrachte ich noch zwei Semester in Freiburg i. B., ein Semester in Berlin, die letzten beiden Semester wieder in Freiburg i. B., wo ich am 18. Juli 1901 die ärztliche Prüfung beendigte. Soldat bin ich nicht gewesen. Vom 1. Oktober 1901 bis 15. April 1902 war ich als Hilfsarzt an der Brandenburgischen Landesirrenanstalt zu Landsberg a. W. angestellt, seit April 1902 bin ich als Assistenzarzt an der Krankenanstalt zu Bremen tätig. Die vorliegende Arbeit habe ich im hiesigen Hygienischen Institute unter Leitung von Herrn Professor Dr. Tjaden angefertigt, dem ich für die Anregung und liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichsten Dank ausspreche.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 2688.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 2688.